# ECL RevelBlOt® Plus

*Substrat chimioluminescent*

**OZYB001-5000** pour 5000 $cm^2$ de membrane (500 ml)
Stockage et stabilité : **un an à +4°C**

# MANUEL D'UTILISATION


BP 268 - 78053 St Quentin Yvelines Cedex - Tél : 01 34 60 24 24 - Fax : 01 34 60 92 12 - email : info@ozyme.fr

## SOMMAIRE

Descriptif ..... P.3
Précautions ..... P.3
Liste des composants ..... P.3
Solutions de travail ..... P.4
Matériels nécessaires ..... P.4
Protocole abrégé de Western blot ..... P.4
Protocole complet de Western blot ..... P.5
Protocole de déshybridation/réhybridation ..... P.6
Résolution des problèmes ..... P.6
Résolution des problèmes (suite) ..... P.7
Produits associés ..... P.8
Avertissement ..... P.9


BP 268 - 78053 St Quentin Yvelines Cedex - Tél : 01 34 60 24 24 - Fax : 01 34 60 92 12 - email : info@ozyme.fr

## DESCRIPTIF

**ECL RevelBlOt® Plus** est un substrat chimioluminescent de l'HRP utilisé pour la détection d'antigènes immobilisés sur membrane (Western blot). L'intensité du signal permet d'obtenir un seuil de sensibilité de l'ordre du picogramme.

## PRÉCAUTIONS

- Afin d'obtenir le meilleur rapport signal/bruit de fond, il est recommandé :
  - D'optimiser les concentrations d'anticorps primaire et secondaire.
  - De tester plusieurs bloquants et de déterminer empiriquement celui qui convient le mieux.
  - D'ajouter du Tween®-20 dans les tampons de blocage et de dilution des anticorps afin de réduire les signaux non spécifiques.

Tout au long du protocole, la membrane ne doit jamais sécher. Assurez-vous, pour cela, d'utiliser la quantité idoine de tampons, qu'il s'agisse du tampon de blocage, du tampon de lavage, de l'anticorps dilué ou de la solution active **ECL RevelBlOt® Plus.**

- Il est recommandé de procéder aux incubations sur une plateforme d'agitation ou un système équivalent.
- Lors de la manipulation des films ou des réactifs de détection porter des gants exempts de poudre ou utiliser des pinces.
- Ne pas utiliser d'azide de sodium (sodium azide) comme agent de conservation des tampons car c'est un inhibiteur de l'HRP.
- Utiliser des ustensiles propres. Les traces de rouille sur les ciseaux, pinces peuvent provoquer un bruit de fond élevé.
- La solution active **ECL RevelBlOt® Plus** est stable 8 heures à température ambiante. Si elle n'est pas utilisée extemporanément, conserver la dans une bouteille opaque.

## LISTE DES COMPOSANTS

| | Solution A - Bouteille marron | Solution B - Bouteille claire |
|---|---|---|
| **OZYB001-5000**<br>Pour 5000 $cm^2$ de membrane | 250 ml Luminol/Enhancer | 250 ml de tampon Péroxide |


BP 268 - 78053 St Quentin Yvelines Cedex - Tél : 01 34 60 24 24 - Fax : 01 34 60 92 12 - email : info@ozyme.fr

## SOLUTIONS DE TRAVAIL

- Tampon de dilution : Tris-Buffered Saline (TBS)
- Tampon de lavage : TBS-Tween 0,1%
- Tampon de blocage : dissoudre l'agent bloquant (lait en poudre non gras, BSA, etc..) dans du TBS-Tween 0,1%

- **Anticorps primaire** : préparer une solution mère à 1 mg/ml de l'anticorps spécifique de l'antigène à détecter dans le tampon de dilution. Pour obtenir la solution prête à l'emploi, diluer cette solution mère dans le tampon de blocage selon les recommandations de dilution du fabricant. En condition standard, la dilution est entre 1:1000 et 1:5000 ou 0,2-1 µg/ml.

- **Anticorps secondaire conjugué HRP** : pour obtenir la solution prête à l'emploi, diluer celui-ci dans le tampon de blocage. Suivre les recommandations du fabricant pour optimiser la dilution. En condition standard, pour un anticorps conjugué HRP à 1 mg/ml, la dilution est entre 1:10 000 et 1:50 000 ou 20 à 100 ng/ml.

- **Solution active ECL RevelBlOt® Plus** : elle est obtenue en mélangeant à quantité égale (50/50) la solution A (Luminol/Enhancer, contenue dans la bouteille marron) et la solution B (tampon Péroxide, contenue dans la bouteille claire).

## MATÉRIELS NÉCESSAIRES

- Cuves d'électrophorèse de protéines, appareil pour transfert sur membrane de Western blot.

- Membrane de nitrocellulose (ou PVDF) pour application Western blot.

- Plateforme d'agitation ou système équivalent.

- Détection :
  - Imageur doté d'une caméra CCD compatible avec la détection de signaux faibles et configuré pour le Western blot.

  ou
  - Film sensible aux rayons X, cassette et réactifs de fixation et de développement dédiés à l'autoradiographie.

## PROTOCOLE ABRÉGÉ DE WESTERN BLOT

| ÉTAPE 1 | ÉTAPE 2 | ÉTAPE 3 |
|---|---|---|
| Séparation des protéines par éléctrophorèse | Transfert sur membrane | Blocage des sites non spécifiques |
| **ÉTAPE 4** | **ÉTAPE 5** | **ÉTAPE 6** |
| Incubation avec l'anticorps primaire spécifique de l'antigène à détecter | Premier lavage de la membrane | Incubation de la membrane avec l'anticorps secondaire conjugué à l'HRP |
| **ÉTAPE 7** | **ÉTAPE 8** | **ÉTAPE 9** |
| Deuxième lavage de la membrane | Incubation 5 minutes avec la solution active **ECL RevelBlOt®** Plus (50/50 solution A et solution B) | Exposition de la membrane à un film sensible aux rayons X ou utilisation d'un imageur configuré pour le Western blot |


BP 268 - 78053 St Quentin Yvelines Cedex - Tél : 01 34 60 24 24 - Fax : 01 34 60 92 12 - email : info@ozyme.fr

# PROTOCOLE COMPLET DE WESTERN BLOT

**Étape 1 –** Séparer la protéine portant l'antigène d'intérêt par électrophorèse.

**Étape 2** – Transférer les protéines sur une membrane de nitrocellulose (une membrane PVDF ou d'autre nature peut être utilisée ; le cas échéant, des optimisations peuvent être requises).

**Étape 3** – Incuber la membrane dans le tampon de blocage pendant 1 heure à température ambiante sur une plateforme d'agitation ou système équivalent. Alternativement, la membrane peut être incubée toujours dans le tampon de blocage sur la nuit, entre +2°C et +8°C.

**Étape 4** – Éliminer le tampon de blocage. Incuber la membrane avec l'anticorps dilué pendant 1 heure sur une plateforme d'agitation ou système équivalent. Suivre les dilutions recommandées dans la section « Solutions de travail ».

**Étape 5** – Laver la membrane dans le tampon de lavage sur une plateforme d'agitation ou système équivalent en faisant au moins 4 à 6 lavages de 5 minutes ou plus chacun. Chaque lavage est effectué à température ambiante avec du tampon de lavage frais. L'augmentation du volume de tampon et du nombre de lavage réduit le niveau de bruit de fond.

**Étape 6** – Rincer la membrane et incuber sur une plateforme d'agitation ou système équivalent pendant une heure avec l'anticorps secondaire conjugué HRP dilué. Suivre les dilutions recommandées dans la section « Solutions de travail ».

**Étape 7** – Laver la membrane (voir étape 5).

**Étape 8** – Incuber la membrane dans la solution active **ECL RevelBlOt® Plus** (voir section « Solutions de travail ») pendant 5 minutes. Le volume total doit couvrir la membrane ; en condition standard, utiliser 0,1 ml de solution active **ECL RevelBlOt® Plus** par $cm^2$ de membrane. La solution active **ECL RevelBlOt® Plus** est stable 8 heures à température ambiante. L'incubation peut être réalisée à la lumière du jour ou dans une pièce normalement éclairée, mais pas à proximité d'une lumière intense. Si la solution active **ECL RevelBlOt® Plus** n'est pas utilisée extemporanément, protéger-la de la lumière en la conservant dans une bouteille opaque.

**Étape 9** – Retirer la membrane de la solution active **ECL RevelBlOt® Plus**

- Évacuer l'excès de réactif de détection en tenant la membrane verticalement et en mettant un des bord de celle-ci en contact avec un papier absorbant.

- Envelopper la membrane dans du film plastique extra-fin transparent, type « Saran Wrap » ou équivalent. Prendre garde à éliminer l'excès de liquide et les bulles d'air. Rappel : la membrane ne doit jamais sécher (voir section "Précautions").

- Révélation par autoradiographie sur film :
  - Placer la membrane ainsi protégée dans une cassette pour film sensible aux rayons X, côté protéines vers le haut. Le film sensible aux rayons X doit rester sec pendant l'exposition. Assurez-vous que la membrane humide ne soit jamais en contact avec le film.
  - Éteindre la lumière, placer le film sur le dessus de la membrane, fermer la cassette. Ne pas bouger le film durant le temps de l'exposition pour éviter tout artefact.
  - Exposer une minute. Le temps d'exposition peut varier pour optimiser les résultats.

- Retirer le film et placer immédiatement un nouveau film non exposé. Refermer la cassette. L'émission lumineuse dure plusieurs heures avec une intensité maximale entre 5 et 30 minutes après l'incubation du **ECL RevelBlOt® Plus,** puis décroit ensuite au fil du temps. Il est donc possible, si besoin, de refaire une ou plusieurs autres expositions avec de nouveaux films. Cependant, la demi-vie de l'enzyme HRP est telle que des temps d'exposition plus longs peuvent être nécessaires.

- Développer le film avec les réactifs de fixation et développement adéquats.

- Révélation à l'aide d'un imageur : l'appareil doté d'une caméra CCD doit être configuré pour le Western blot.
  - Le temps d'exposition varie d'une machine à l'autre et peut être plus long qu'avec un film autoradiographique.

*Note : en fin de protocole, vous pouvez stocker la membrane enveloppée dans le film transparent type "Saran Wrap" à une température de +2°C à +8°C. La membrane peut être déshybridée et réhybridée plusieurs fois.*

## PROTOCOLE DE DÉSHYBRIDATION/RÉHYBRIDATION

**Étape 1** – Plonger la membrane dans le tampon de déshybridation (2-Mercaptoéthanol 100 mM, SDS 2%, Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,7) et incuber 30 minutes à 50°C. Si vous voulez travailler dans des conditions plus stringentes, l'incubation peut se faire à 70°C sur une durée supérieure à 30 min.

**Étape 2** – Incuber la membrane 2 x 10 minutes à température ambiante dans du tampon PBS-Tween ou TBS-T. Remarque : à la suite de cette étape, la membrane peut être incubée avec la solution active **ECL RevelBlOt® Plus** et ensuite exposée sur un film ou dans un imageur CCD pour vérifier l'absence de tout signal.

**Étape 3** – Incuber la membrane dans le tampon de blocage (voir section « Solutions de travail ») pendant 1 heure à température ambiante.

**Étape 4** – Reprendre le protocole de Western blot à l'étape 4.

## RÉSOLUTION DES PROBLÈMES

**1.Bruit de fond élevé**

| Causes possibles | Remarques / Solutions |
|---|---|
| Concentrations d'anticorps trop élevées | • Diluer les concentrations d'anticorps primaires et/ou secondaires |
| Agent bloquant inopérant | • Vérifier que le tampon de blocage a été préparé correctement<br>• Assurez-vous que l'agent bloquant est bien présent dans les solutions diluées d'anticorps primaires et secondaires<br>• Changer l'agent bloquant : 1 à 10% de BSA en TBS-Tween ou PBS-Tween (préparé extemporanément) ; 0,5% à 3% de gélatine en TBS-T ou PBS-Tween (préparé extemporanément) |
| Lavage inefficace | • Augmenter le temps de lavage et le volume de tampon de lavage<br>• Ajouter du Tween (si ce n'est pas déjà fait)<br>• Augmenter la concentration de Tween dans le tampon de lavage |
| Tampons contaminés | • Assurez-vous que tous les tampons soient préparés extemporanément et filtrés |

| | |
|---|---|
| Contamination du matériel (cuves / appareil de transfert). | • Nettoyer ou remplacer les appareils |
| Problèmes de membrane | • Vérifier que la membrane est complètement immergée et reste bien humidifiée dans toutes les solutions<br>• Utiliser des membranes de nitrocellulose (ou PVDF) de bonne qualité<br>• Une membrane abîmée peut provoquer une fixation non spécifique des anticorps. Manipuler la membrane avec précaution à l'aide de gants exempts de poudre (voir section « Précautions »)<br>• Utiliser des pinces propres pour manipuler la membrane après lavage |
| Solution de détection **ECL RevelBlOt® Plus** | • Excès de Solution Active **ECL RevelBlOt® Plus.** Éliminer bien l'excès avec un papier absorbant avant de placer la membrane dans la cassette |
| Surexposition (film ou imageur ) | • Exposer le film pendant un temps plus court (15 secondes peuvent suffire). Si la durée d'exposition est trop courte pour une manipulation aisée, réduire la concentration en anticorps<br>• Laisser la membrane à l'obscurité avant d'exposer de nouveau.<br>• Avec un imageur configuré pour le Western blot, il est possible d'utiliser un temps d'exposition court, puis d'accumuler le signal en série |

**2. Signal faible, aucun signal**

| Causes possibles | Remarques / Solutions |
|---|---|
| Protéines non transférées durant le Western blot | • Colorer les protéines pour vérifier l'efficacité du transfert<br>• Optimiser la concentration d'acrylamide dans le gel, le temps de transfert, le voltage à l'aide de marqueurs couvrant le poids moléculaire attendu (le poids moléculaire et le rayon de Stoke de la protéine affectent le transfert). Vous pouvez aussi utiliser une protéine connue comme contrôle positif |
| Quantité trop faible d'antigènes ou d'anticorps | • Augmenter la quantité de protéines portant l'antigène d'intérêt<br>• Augmenter la concentration et le temps d'incubation de l'anticorps primaire. Une optimisation peut être nécessaire |
| Fixation faible de l'anticorps primaire | • Assurez-vous que l'antigénicité de la protéine n'a pas été affectée par les traitements inhérents à l'électrophorèse (SDS, urée, dénaturation, etc.. ). Vérifier la capacité de fixation de l'anticorps à l'antigène par Dot blot |
| HRP en excès | • Une quantité excessive d'HRP peut provoquer la déplétion du substrat **ECL RevelBlOt® Plus** et l'extinction rapide du signal. Diluer l'anticorps conjugué à l'HRP au moins 10 fois |
| Diminution d'activité de l'HRP ou du substrat **ECL RevelBlOt® Plus** | • Vérifier que la solution active **ECL RevelBlOt® Plus** et les solutions A (Luminol/Enhancer) et B (tampon Péroxide) ont été stockées et utilisées dans de bonnes conditions<br>• Tester l'activité de l'HRP : préparer un petit volume (1 ml) de solution active **ECL RevelBlOt® Plus.** Dans le noir, y ajouter 1 µl d'anticorps conjugué HRP non dilué. Une lumière bleue doit être visible à l'oeil nu |


BP 268 - 78053 St Quentin Yvelines Cedex - Tél : 01 34 60 24 24 - Fax : 01 34 60 92 12 - email : info@ozyme.fr

### 3. Bandes non spécifiques

| Cause possible | Remarques / solutions |
|---|---|
| HRP en excès | • Diluer l'anticorps conjugué à l'HRP au moins 10 fois |

### 4. Répartition inégale des signaux

| Causes possibles | Remarques / solutions |
|---|---|
| Transfert de protéines inefficace | • Voir ci-dessus (aucun signal) |
| Membrane non immergée d'une manière homogène | • Recommencer avec une nouvelle membrane<br>• Assurez-vous que la membrane soit en permanence entièrement recouverte durant les incubations |
| Contamination par des empreintes de doigts et/ou de la kératine | • Eviter de toucher la membrane. Utiliser des gants et des pinces |
| Présence de bulles entre le film et la membrane | • Eliminer les bulles. Exposer à nouveau |

### 5. Bandes blanches (négatives) sur le film

| Cause possible | Remarques / Solutions |
|---|---|
| Excès d'HRP | • Diluer l'anticorps conjugué à l'HRP au moins 10 fois |

## PRODUITS ASSOCIÉS

Ozyme recommande les produits suivants

### Anticorps secondaires

| Western Blot | | |
|---|---|---|
| **Anti-Lapin** | | |
| 7074S | Goat Anti-Rabbit IgG, HRP-linked Antibody | 1 ml |
| DKXRB-003DHRPX | Donkey anti-Rabbit IgG (H&L) - Affinity Pure, HRP Conjugate | 1 mg |
| CKXRB-003DHRPX | Chicken anti-Rabbit IgG (H&L) - Affinity Pure, HRP Conjugate | 1 mg |
| SHXRB-003DHRPX | Sheep anti-Rabbit IgG (H&L) - Affinity Pure, HRP Conjugate | 1 mg |
| **Anti-souris** | | |
| 7076S | Horse Anti-Mouse IgG, HRP-linked Antibody | 1 ml |
| RBXMU-003DHRPX | Rabbit anti-Mouse IgG (H&L) - Affinity Pure, HRP Conjugate | 1 mg |
| DKXMU-003DHRPX | Donkey anti-Mouse IgG (H&L) - Affinity Pure, HRP Conjugate | 1 mg |
| CKXMU-003DHRPX | Chicken anti-Mouse IgG (H&L) - Affinity Pure, HRP Conjugate | 1 mg |


BP 268 - 78053 St Quentin Yvelines Cedex - Tél : 01 34 60 24 24 - Fax : 01 34 60 92 12 - email : info@ozyme.fr

| | | |
|---|---|---|
| **Anti-Rat** | | |
| 7077S | Goat Anti-Rat IgG, HRP-linked Antibody | 1 ml |
| RBXRT-003DHRPX | Rabbit anti-Rat IgG (H&L) - Affinity Pure, HRP Conjugate | 1 mg |
| DKXRT-003DHRPX | Donkey anti-Rat IgG (H&L) - Affinity Pure, HRP Conjugate | 1 mg |
| CKXRT-003DHRPX | Chicken anti-Rat IgG (H&L) - Affinity Pure, HRP Conjugate | 1 mg |
| **Anti-Biotine** | | |
| 7075S | Goat Anti-Biotin IgG, HRP-linked Antibody | 1 ml |

| | | |
|---|---|---|
| **Western Blot après immunoprécipitation** | | |
| 5127S | Mouse Anti-rabbit IgG (Conformation Specific) (L27A9) mAb (HRP Conjugate) | 100 µl |

### Marqueurs de Poids moléculaire

Non coloré :

| | | |
|---|---|---|
| TAK3450Z | Protein Molecular Weight Marker (Low) | 50 µl (200 lanes) |
| TAK3451Z | Protein Molecular Weight Marker (High) | 50 µl (200 lanes) |
| TAK3452Z | Protein Molecular Weight Marker (Broad) | 50 µl (200 lanes) |

Coloré 1 couleur :

| | | |
|---|---|---|
| 7720L | Prestained Protein Marker Broad Range (Premixed Format) | 350 lanes |
| 7720S | Prestained Protein Marker, Broad Range (Premixed Format) | 70 lanes |

Coloré 4 couleurs :

| | | |
|---|---|---|
| LON00193837 | ProSieve QuadColor™ Protein Marker | 500 µl |

### Gels prêts à l'emploi

Gamme PAGEr de gels Tris-Glycine (T-G). Nombreux formats et % de T-G en % unique ou en gradient.

### Imageurs

Contactez la division instrumentation d'Ozyme au : 01 30 85 92 89 ou equipement@ozyme.fr

## AVERTISSEMENT

**Ce produit est à usage de recherche uniquement.**